

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Katarina Petrinović

UKLANJANJE SINTETSKOG BOJILA MALAHITNOG ZELENILA IZ
VODENIH OTOPINA UPOTREBOM RAZLIČITIH BIOADSORBENSA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za bioprocesno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Procesi obradbe otpadnih voda
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. lipnja 2014.
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić*
Pomoć pri izradi: dr.sc. *Tihana Marček*

UKLANJANJE SINTETSKOG BOJILA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENIH OTOPINA UPOTREBOM RAZLIČITIH BIOADSORBENSA

Katarina Petrinović, 200-DI

Sažetak:

Otpadne vode iz industrija koje koriste sintetska bojila predstavljaju ekološki problem, zbog kemijske stabilnosti bojila i otpornosti na razgradnju pomoću mikroorganizama. Adsorpcija je jedna od najčešće korištenih i najučinkovitijih metoda za uklanjanje bojila iz otpadnih voda, pri čemu se upotrebom odgovarajućeg adsorbensa osigurava kakvoća efluenta za ispušt u prirodne prijemnike. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal šest bioadsorbensa za uklanjanje malahitnog zelenila iz vodenih otopina adsorpcijom. Kao bioadsorbensi korišteni su lignocelulozni otpadni materijali drvne industrije (piljevine topole, hrasta i bukve) i prehrambene industrije (repini rezanci, pivski trop i trop jabuke). Postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine bojila koncentracije 15 mg L^{-1} ($m_{\text{adsorbensa}} = 1 \text{ g}$, $V_{\text{adsorbata}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme kontakta 300 min) iznosio je više od 90% za sve korištene bioadsorbense. Piljevina topole i pivski trop pokazali su se najpogodniji za daljnja istraživanja, pri čemu je ispitan utjecaj početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i pH na postotak uklanjanja malahitnog zelenila. Smanjenjem početne koncentracije bojila i povećanjem mase adsorbensa došlo je do povećanja postotka uklanjanja, što je najbolje vidljivo u prvih 30 min eksperimenta kada je uklanjanje bojila najintenzivnije, dok je nakon 300 min razlika u postotku uklanjanja vrlo mala za sve provedene eksperimente. Temperatura nije imala značajnijeg utjecaja na postotak uklanjanja bojila, dok je smanjenje pH (pH 2,5) uzrokovalo značajno smanjenje postotka uklanjanja bojila za oba bioadsorbensa. Obojeni pivski trop biološki je obrađen pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* uzgajane u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u trajanju od 30 dana, pri čemu je došlo do kontinuiranog porasta ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu.

Ključne riječi: malahitno zelenilo, adsorpcija, bioadsorbensi, *T. versicolor*, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 49 stranica
24 slika
1 tablica
2 priloga
42 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>	predsjednik
2.	doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Damir Hasenay</i>	član
4.	doc. dr. sc. <i>Mirna Habuda-Stanić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 22. prosinca 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of Bioprocess Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Wastewater treatment processes
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IX held on July 18th, 2014.
Mentor: *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.
Tehcnical assistance: *Tihana Marček*, PhD

REMOVAL OF SYNTHETIC DYE MALACHITE GREEN FROM AQUEOUS SOLUTIONS USING DIFFERENT BIOADSORBENTS

Katarina Petrinović, 200-DI

Summary:

Adsorption is broadly used and most effective method for dyes removal from the wastewaters. The objective of this study was to explore the potential of six bioadsorbents for removal of malachite green from aqueous solution by adsorption. Lignocellulosic waste materials from wood industry (poplar sawdust, oak sawdust and beech sawdust) and food industry (sugar beet waste, spent beer grains and apple pomace) were used as bioadsorbents. The percentage of malachite green removal from aqueous solution concentration of 15 mg L⁻¹ ($m_{\text{adsorbens}}=1 \text{ g}$, $V_{\text{dye solution}} = 100 \text{ mL}$, $t=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, contact time 300 min) was more than 90% for all tested bioadsorbents. Poplar sawdust and spent beer grains proved to be the most suitable adsorbents for further studies in which the influence of the initial dye concentration, mass of adsorbent, temperature and solution pH on the percentage removal of malachite green was investigated. The percentage of dye removal increased with the decrease of the initial dye concentration and increase of the adsorbent mass, which was the most obvious within the first 30 min of the experiment. After 300 min contact time the percentage removal difference was insignificant for all the experiments. The temperature had no significant effect on the percentage of dye removal, while the decrease in pH (pH 2,5) caused significant reduction of the percentage of dye removal in both bioadsorbents. White-rot fungus *T. versicolor* was cultivated under solid-state conditions for 30 days using dye-adsorbed spent beer grains as a substrate. The continuous increase of total colour change and colour intensity change of fermented samples compared to their abiotic controls was observed.

Key words: malachite green, adsorption, bioadsorbents, *T. versicolor*, solid-state fermentation

Thesis contains: 49 pages
24 figures
1 table
2 supplements
42 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. <i>Marina Tišma</i> , PhD, assistant prof.	chair person
2. <i>Natalija Velić</i> , PhD, assistant prof.	supervisor
3. <i>Damir Hasenay</i> , PhD, prof.	member
4. <i>Mirna Habuda-Stanić</i> , PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: December 22, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Velić na bezgraničnom strpljenju, podršci i pomoći u svakom trenutku, te savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Tehničarki Jelki Babić i dr. sc. Tihani Marček na svom trudu i ugodnom društvu prilikom rada u laboratoriju.

Svima koji su na bilo koji način doprinijeli završetku ovo rada.

Kolegicama i prijateljima na podršci, pomoći i druženju tijekom studija, posebno Tamari Jurić za ugodno provedene sate u laboratoriju, veliku potporu i optimizam.

Najviše zahvaljujem svojim roditeljima na bezgraničnoj podršci, nesebičnoj pomoći i motivaciji tijekom svih ovih godina, sestrama koje su uvijek bile uz mene kao i svojoj cijeloj obitelji.

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	SINTETSKA BOJILA.....	4
2.1.1.	Općenito o bojilima.....	4
2.1.2.	Podjela bojila.....	4
2.1.3.	Utjecaj sintetskih bojila na okoliš i zdravlje ljudi	5
2.1.4.	Malahitno zelenilo	5
2.1.5.	Zakonska regulativa	6
2.2.	POSTUPCI UKLANJANJA BOJILA IZ OTPADNIH VODA.....	7
2.2.1.	Adsorpcija	8
2.3.	LIGNOCELULOZNI MATERIJALI KAO ADSORBENSI	9
2.4.	PRIMJENA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA ZA OBRADU OBOJENIH LIGNOCELULOZNIH SUPSTRATA.....	10
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1.	ZADATAK.....	13
3.2.	MATERIJALI	13
3.2.1.	Adsorbensi	13
3.2.2.	Adsorbat.....	14
3.2.3.	Kemikalije.....	14
3.2.4.	Mikroorganizam	14
3.3.	APARATURA	15
3.3.1.	Tehnička i analitička vaga	15
3.3.2.	Laboratorijski mlin	15
3.3.3.	Inkubator	16
3.3.4.	Centrifuga	16
3.3.5.	Spektrofotometar	17
3.3.6.	pH-metar.....	17
3.3.7.	Analizator vlage.....	17
3.3.8.	Autoklav	18
3.3.9.	Sušionik.....	18
3.3.10.	Kromametar	18
3.4.	METODE.....	19
3.4.1.	Šaržni adsorpcijski eksperimenti.....	19
3.4.2.	Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za uzgoj na obojenom pivskom tropu kao čvrstom nosaču	19

3.4.3.	Uzgoj gljive bijelog truljenja <i>T. versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstom supstratu (obojeni pivski trop).....	20
3.4.4.	Određivanje udjela vode.....	20
3.4.5.	Određivanje boje uzorka.....	20
4.	REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1.	UKLANJANJE MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA RAZLIČITE LIGNOCELULOZNE MATERIJALE KAO BIOADSORBENSE.....	23
4.2.	UTJECAJ KONCENTRACIJE BOJILA NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADOSRPCIJOM NA PILJEVINU TOPOLE I PIVSKI TROP KAO BIOADSORBENSE	25
4.3.	UTJECAJ MASE ADSORBENSA NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADOSRPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE	27
4.4.	UTJECAJ TEMPERATURE NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADOSRPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE.....	28
4.5.	UTJECAJ pH NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADOSRPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE.....	30
4.6.	BIOLOŠKA OBRADA OBOJENOG PIVSKOG TOPA POMOĆU GLJIVE BIJLOG TRULJENJA <i>T. versicolor</i> ...	32
5.	ZAKLJUČCI	35
6.	LITERATURA	38
7.	PRILOZI	42

1. UVOD

Otpadne vode iz industrija koje uključuju primjenu različitih bojila predstavljaju veliki ekološki problem. One često sadrže različite organske spojeve čija je prisutnost u okolišu također nepoželjna, te se ne mogu ispustiti u okoliš bez prethodne odgovarajuće obrade. Upotrijebljena voda opterećena otpadnim organskim i anorganskim tvarima ispušta se u različite prirodne prijamnike (recipijente): vodotoke, jezera ili mora. Prisutne onečišćujuće tvari ugrožavaju biološku ravnotežu vodenih ekosustava i mogu dovesti u pitanje njihov opstanak.

Sintetska bojila predstavljaju skupinu spojeva, koji su po svojoj prirodi ksenobiotici te imaju nepoželjan utjecaj kako na okoliš tako i na ljudsko zdravlje. Bojilo se može definirati kao tvar koja daje boju supstratu na koji je aplicirana. Organska sintetska bojila, koja se najčešće koriste, često su vrlo otporna na djelovanje mikroorganizama, svjetla ili temperature te se primjenom konvencionalnih procesa obrade obojenih otpadnih voda ne postiže zadovoljavajuća učinkovitost njihova uklanjanja (Wang i sur., 2008.). Jedno od najpoznatijih bazičnih (kationskih) bojila je malahitno zelenilo, koje se tradicionalno koristilo za bojanje kože, papira i svile, dok je u novije vrijeme svoju značajnu primjenu pronašlo kao bojilo u mikrobiologiji i forenzici.

Neki od ciljeva uklanjanja bojila iz otpadnih voda su: ponovna uporaba pročišćene otpadne vode, što je prednost i s ekološkog i sa stajališta ekonomske isplativosti; smanjenje onečišćenja površinskih voda; smanjenje bioakumulacije bojila te drugih kemikalija, kojima je popraćena njihova proizvodnja i primjena u okolišu; itd. (Gudelj i sur., 2011.).

Istraživane su i razvijene različite fizikalne, kemijske i biološke metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda, ali su tek neke od njih našle svoju primjenu u realnim sustavima, poput tekstilne industrije ili industrije papira (Ghoreishi i Haghighi, 2003.). Adsorpcija je svakako jedna od najčešće korištenih i najučinkovitijih metoda, jer upotrebom odgovarajućeg adsorbensa daje efluent odgovarajuće kakvoće za ispust u prijemnik. Pri tome je najčešće korišteni adsorbens aktivni ugljen, čija primjena uključuje visoku cijenu. Kao alternativa upotrebi aktivnog ugljena i ostalih skupih konvencionalnih adsorbensa, u novije se vrijeme istražuje mogućnost primjene otpadnih lignoceluloznih materijala kao jeftinih bioadsorbensa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SINTETSKA BOJILA

2.1.1. Općenito o bojilima

Bojila su tvari koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra, a imaju sposobnost bojenja različitih materijala poput tekstila, krzna, kože, papira, polimernih materijala, živežnih namirnica, farmaceutskih preparata i sl. Bojila ulaze u materijal, tvore s njim kemijsku vezu, vežu se privlačnim silama ili unutar materijala tvore netopljive spojeve. Neka tvar pokazuje obojenost ako apsorbira dio svjetlosti koja na nju pada, dok njezina boja ovisi o preostalom dijelu svjetlosti koji se propušta ili reflektira. Njihova boja posljedica je apsorpcije svjetlosti iz vidljivog dijela spektra, odnosno svjetlosnih valova valnih duljina od 380 do 760 nm (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf). Zajedničko kemijsko svojstvo svih tvari koje pokazuju obojenost je nezasićenost veza u strukturi njihove molekule (Gudelj i sur., 2011.). Obojenost ovisi o broju i razmještanju dvostrukih veza i kromofora, odnosno o kemijskoj strukturi tvari. Svako bojilo mora u molekuli sadržavati kromofornu skupinu koja je nosilac boje (karbonilna C=O , etilenska C=C , nitrozo-skupina N=O , azo-skupina N=N) i auktokromnu skupinu (OH , NH_2 , SO_3H , COOH) koja omogućuje vezanje bojila za podlogu. Spoj kromofora i auktokroma zove se kromogen (Pervan i sur., 2006.). Većina organskih sintetskih bojila ima aromatsku strukturu benzenskog i/ili naftalenskog tipa.

2.1.2. Podjela bojila

Sva bojila mogu se prema podrijetlu podijeliti na prirodna i sintetska (Gudelj i sur., 2011.). Prirodna bojila, iako dugo poznata, danas se malo koriste zbog njihove slabije učinkovitosti i visoke cijene. Dobivaju se uglavnom iz korijenja, kore ili lišća biljaka te iz različitih insekata. Sintetska bojila dobivaju se kemijskom sintezom, učinkovitost im je visoka, a cijena relativno niska u usporedbi s prirodnim bojilima.

Prema karakteru auktokromne skupine bojila se dijele na kisela, bazična, supstantivna, redukcijska, disperzijska, reakcijska; dok se prema kromofornim skupinama dijele na azo-bojila, nitro-bojila, antrakinonska, azinska, oksazinska, stilbenska, sumporna, trifenil-metanska bojila i dr. (<http://enciklopedija.lzmk.hr/clanak.aspx?id=44848>).

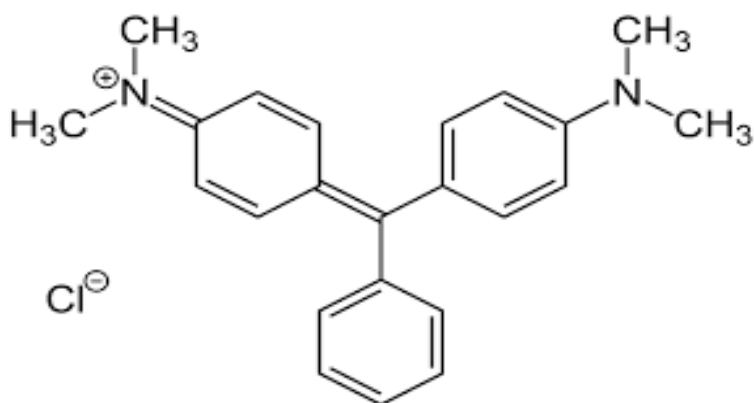
2.1.3. Utjecaj sintetskih bojila na okoliš i zdravlje ljudi

Bojila su izrazito složene strukture i izražene postojanosti s obzirom na djelovanje svjetlosti, promjene temperature, djelovanje detergenata. U okolišu se teško razgrađuju i gube obojenost te ih je nužno ukloniti prije ispuštanja u okoliš (Gudelj i sur., 2011.). Proces uklanjanja takvih složenih spojeva dugotrajan je i složen. Uklanjanje obojenja ne podrazumijeva uvijek i smanjenje toksičnosti. Nepotpuna razgradnja i nastanak još toksičnijih razgradnih spojeva čine dodatan problem (Eichlerova i sur., 2007.). Spojevi koji nastaju razgradnjom bojila mogu smanjiti prodiranje svjetlosti u vodu što rezultira smanjenom koncentracijom kisika u vodotocima. Sama bojila djeluju toksično i štete flori i fauni vodotoka (Saratale i sur., 2011.). Mnoga bojila imaju mutageni i kancerogeni učinak na ljude.

2.1.4. Malahitno zelenilo

Malahitno zelenilo je bazično organsko bojilo trifenilmetanskoga reda. Trifenilmetanska ili triarilmetanska bojila derivati su trifenilmetana gdje su atomi vodika triju arilnih skupina supstituirani s amino, hidroksilnim ili sulfonskim skupinama. Bojila iz ove skupine čine 30-40% od ukupne potrošnje svih bojila, a najčešće se upotrebljavaju u tekstilnoj industriji, u biologiji i medicini kao indikatori, u industriji papira i kože, za bojenje plastike, benzina, lakova, masti, ulja i voskova te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Ogugbue, 2011., Azmi, 1998.).

Formula malahitnog zelenila je $[C_6H_5C(C_6H_4N(CH_3)_2)_2]Cl$ (**Slika 1**). Malahitno zelenilo je kristalni prah metalnog sjaja i boje nalik na mineral malahit (**Slika 2**). Upotrebljava se u tekstilnoj industriji za bojenje svile, kože, pamuka, vune i jute. Također se koristi i kao prehrambeni aditiv, te kao fungicid i baktericid. Osim što negativno utječe na okoliš, generalno se smatra toksičnim i kancerogenim, budući da produkti njegove razgradnje pokazuju mutageno djelovanje (Cheriaa, 2012.). Vrlo je otrovan za stanice sisavaca te može uzrokovati tumor bubrega kod miševa i reproduktivne probleme u kunića i riba (Anbia i sur., 2011.). Štoviše, malahitno zelenilo ima štetne učinke na jetru, bubrege, crijeva i spolne žlijezde vodenih organizama (Srivastva i sur., 2004.). Osim kancerogenosti, u ljudi može izazvati i iritaciju gastrointestinalnog trakta udisanjem ili gutanjem (Garg i sur., 2004.). U kontaktu s kožom izaziva iritaciju popraćenu crvenilom i boli.



Slika 1 Strukturna formula malahitnog zelenila



Slika 2 Kristal malahit: <http://www.crystalvaults.com/crystal-encyclopedia/malachite>
[2.11.2014.]

2.1.5. Zakonska regulativa

Danas postoji cijeli niz zakonskih propisa kojima se od proizvođača zahtijeva definiranje štetnosti svakog proizvoda, njegove toksičnosti, iritabilnost kože i oči, fotosenzitivnost, mutagenost i slično (Gudelj i sur., 2011.).

Prema regulativi Europske zajednice REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), sve kemikalije koje se proizvode, stavljaju u promet i upotrebljuju moraju biti registrirane, neovisno o tome smatraju li se opasnim ili neopasnim (Gudelj i sur., 2011.).

Proizvođači tekstila, odjeće i ostali koji svoje proizvode žele plasirati na tržište Europske unije suočeni su sa zahtjevima jamstva ekološke prihvatljivosti svojih proizvoda. Ti kriteriji odnose se na vlakna, procese i kemikalije koji mogu dospjeti na tekstil u proizvodnji, preradi i oplemenjivanju te na ekološke zahtjeve vezane uz ponašanje proizvoda pri upotrebi. Na temelju ispunjenih tako definiranih zahtjeva stječe se pravo uporabe EZ-oznake ekološke prihvatljivosti (*Zakon o vodama, Uredba o klasifikaciji voda*) (Jurac i sur., 2008.).

Tijekom zadnjih nekoliko godina u brojnim su zemljama postavljeni zakonski uvjeti u vezi zbrinjavanja obojenih otpadnih voda. Oni se neprestano pooštravaju i zahtijevaju pročišćavanje otpadnih voda koje sadrže organska sintetska bojila do stupnja koji je u skladu s ekološkom prihvatljivošću (Gudelj i sur., 2011.).

U Republici Hrvatskoj Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda Prilog 5. (Granične vrijednosti emisija otpadnih voda iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu tekstila) navodi da u površinskim vodama i sustavu javne odvodnje ne smiju biti prisutna bojila (http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1681.html, [5.11.2014.]). Osim toga provjeravaju se fizikalno kemijski, ekotoksikološki, organski i anorganski pokazatelji.

2.2. POSTUPCI UKLANJANJA BOJILA IZ OTPADNIH VODA

Važni onečišćivači voda su industrije koje koriste sintetske boje, poput tekstilne industrije, industrije papira, prehrambene industrije, kožarske industrije, kozmetičke i farmaceutske industrije, itd. Uklanjanje bojila iz otpadnih voda otežano je kako zbog njihove dobre topljivosti, tako i zbog već spomenute postojanosti, odnosno foto- i termo-stabilnosti, kao i teške biorazgradljivosti.

Postoji velik broj metoda koje se koriste za obradu otpadnih voda opterećenih organskim bojilima i koje se mogu podijeliti na fizikalno-kemijske i biološke metode uklanjanja bojila. Vrlo često su sintetska bojila prisutna u industrijskim otpadnim vodama otporna na razgradnju (uklanjanje) pomoću mikroorganizama, stoga su u realnim sustavima najčešće primjenjivane metode fizikalno-kemijske metode, poput adsorpcije, koagulacije i flokulacije, oksidacije s klorom, ozonom ili vodikovim peroksidom, elektrolize, redukcije, elektrokemijske obrade, ionske izmjene, membranskih procesa, itd. Osnovni nedostaci navedenih metoda uključuju visoku cijenu, nedovoljnu učinkovitost i često nastajanje toksičnih razgradnih

produkata ili različitih muljeva (Sandhya i sur., 2005.). Zbog ovoga se sve više koriste biotehnološki postupci uklanjanja bojila iz otpadnih voda, budući da su ekonomski povoljniji u odnosu na fizikalno-kemijske postupke. Nedostatak bioloških postupaka uključuje težu kontrolu procesa, budući da je potrebno osigurati optimalne uvjete za rast i razmnožavanje mikroorganizama koji provode uklanjanje bojila (temperatura, pH, udjel vode, koncentracija kisika, itd.).

2.2.1. Adsorpcija

Adsorpcija, jedan od najčešće korištenih fizikalno-kemijskih postupaka uklanjanja bojila iz otpadnih voda, je pojava nakupljanja neke tvari na površini krute tvari ili tekućine. Odvija se u graničnom području faza, odnosno na granici faza krutina/plin ili krutina/tekućina. Sam proces uključuje povećanje koncentracije određene komponente (adsorbata) na površini čvrste faze (adsorbens) (Gupta, 2009.). Adsorbensi su tvari koje imaju veliku površinu po jedinici mase kao posljedica velike poroznosti ili usitnjavanja. Adsorpcija je posljedica djelovanja privlačnih sila između površine adsorbensa i molekula u otopini odnosno plinu. Radi se o egzotermnom procesu koji se odvija velikom brzinom, uslijed male energije aktivacije. Prema prirodi privlačnih sila koje zadržavaju adsorbirane čestice na površini krute faze, razlikujemo fizikalne i kemijske adsorpcijske procese. Kod fizikalne adsorpcije sile između čvrstog adsorbensa i molekula adsorbata su slične van der Waals-ovim silama, dok je kemijska adsorpcija rezultat puno jačih sila vezivanja koje se mogu usporediti s onima koje dovode do stvaranja kemijskih spojeva. Najčešće korišteni adsorbensi u obradi otpadnih voda su glina, silika gel, aktivni ugljen i različiti prirodni materijali.

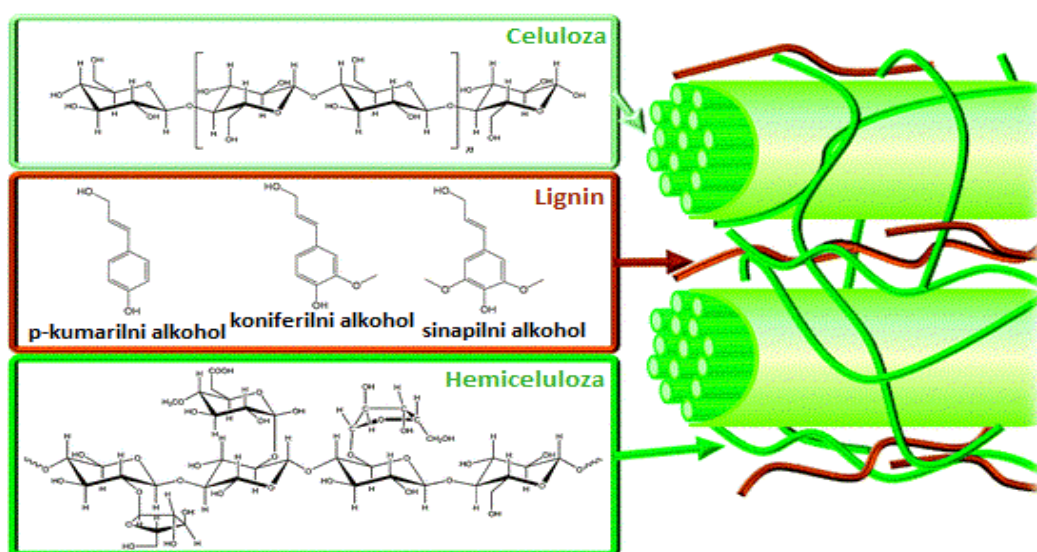
Čimbenici koji utječu na adsorpciju su:

- veličina čestica adsorbensa,
- površina i struktura pora adsorbensa,
- karakteristike adsorbata,
- temperatura,
- pH
- kemijski sastav adsorbensa (Faust i sur., 1999.).

2.3. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI KAO ADSORBENSI

Lignocelulozni materijali predstavljaju primarni izvor obnovljive organske tvari na Zemlji (Alonso i sur., 2005.). Nastaju tijekom cijele godine u velikim količinama. U njih ubrajamo materijale poput piljevine drva, otpadnog papira, trave, slame, žitarice nakon proizvodnje piva, ljuske, lišće, i sl. Ovi materijali su dostupni u velikim količinama i mogu se smatrati potencijalnim adsorbensima zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika. Kada se govori o odabiru i usporedbi različitih adsorbensa, osim njihove učinkovitosti glavni parametar je cijena. Jeftinim adsorbensom možemo nazvati tvar koja zahtjeva malu ili neznatnu obradu i može se naći u prirodi u velikim količinama (Bailey i sur., 1999.).

Lignocelulozni materijali sastoje se od tri skupine polimera – celuloze, hemiceluloze i lignina, koji povezani jedni s drugima formiraju složenu strukturu koja štiti materijal od mikrobiološke razgradnje gljivama ili bakterijama i čiji udjeli ovise o vrsti lignoceluloznog materijala (Janušić i sur., 2008.) Celuloza čini kostur koji je okružen hemicelulozom i ligninom (**Slika 3**) (Mussatto i sur., 2010.) i najvažnija je sastavnica stanične stijenke biljaka. Celuloza je linearni polimer građen od molekula D-glukoze međusobno povezanih β -(1,4)-glikozidnom vezom. Dugi lanci celuloze međusobno povezani čine celulozna vlakna. Hemiceluloza je heterogene strukture i sastoji se od heksoza i pentoza. Lignin je amorfni, aromatski heteropolimer, koji nastaje nasumičnom sintezom iz prekursora koniferilnog, p-kumarilnog i sinapilnog alkohola.



Slika 3 <http://imgarcade.com/1/hemicellulose-cellulose-lignin/> [7.12.2014.]

Otpadni lignocelulozni materijali koji su istraživani kao mogući adsorbensi u ovom radu podrijetlom su iz drvne industrije (piljevine bukve, hrasta i topole) i prehrambene industrije (repini rezanci te trop jabuke i pivski trop). Celuloza je glavna komponenta drva i čini 40-50% suhe tvari drva. Okružuju je hemiceluloza (30%) i lignin (20-30%) koji također daje čvrstoću (Sjostrom, 1993.). Repini rezanci su uglavnom izgrađeni od polisaharida (75-80%) gdje celuloza zauzima 22-30%, hemiceluloza 25-30%, a pektin 25% (Spagnuolo i sur., 1997.). Celuloza je glavna komponenta jabučnog tropa (30%), slijedi je lignin 15%, hemiceluloza 12% i pektin 9% (Wang i Thomas, 1989.). Pivski trop se sastoji od 20% celuloze, 28-30% neceluloznih saharida i 28% lignina (Mussato i sur., 2006.).

Bioadsorbensi su često puno selektivniji od konvencionalnih adsorbensa, poput ionsko-izmjenjivačkih smola ili aktivnog ugljena, te mogu ukloniti bojilo do vrlo malih koncentracija. Korištenje bioadsorbensa stoga predstavlja nov pristup adsorpciji – učinkovit, kompetitivan i jeftin (Rafatullah i sur., 2010.).

2.4. PRIMJENA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA ZA OBRADU OBOJENIH LIGNOCELULOZNIH SUPSTRATA

Gljive bijelog truljenja su najčešći organizmi koji uzrokuju truljenje drveta jer imaju sposobnost degradacije i mineralizacije glavnih komponenti drva - celuloze, hemiceluloze i lignina (Sigoillot i sur., 2012.). Ova skupina obuhvaća velik broj gljiva, uglavnom *Basidiomycota*, koje u prirodi rastu na trulom drveću i drvenom materijalu te ga razgrađuju. Razgradnja lignina rezultira izbijeljenim izgledom istrulog drveta. S obzirom na redoslijed razgradnje polimera drveta razlikuju se simultana (istovremena) razgradnja svih polimera u drvetu i selektivna razgradnja lignina u drvetu (Sigoillot i sur., 2012.). Razgradnja polimera odvija se djelovanjem različitih ekstracelularnih enzima koje ove gljive sintetiziraju, pri čemu su posebno značajni ekstracelularni lignolitički enzimi: mangan peroksidaza (MnP), lignin peroksidaza (LiP) i lakaza.

Gljive bijelog truljenja koriste se u procesu proizvodnje pulpe u industriji papira, za biološko izbijeljivanje pulpe drveta, za proizvodnju enzima te, sve češće, za uklanjanje različitih bojila iz otpadnih voda i razgradnju ksenobiotika (Wesenberg i sur., 2003.). Gljive bijelog truljenja koje su često korištene u istraživanjima s ciljem obrade (obezbojenja), odnosno

bioremedijacije obojenih otpadnih voda su *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*, zbog njihove sposobnosti razgradnje velikog broja ksenobiotika (Forgacs i sur., 2004.). U ovom radu korištena je gljiva *Trametes versicolor* koja je uzgajana u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid-state Fermentation*, SSF) na obojenom lignoceluloznom materijalu (pivski trop) kao nosaču i supstratu. Uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima označava procese koji se provode u odsutnosti slobodne vode na materijalima koji nisu topljivi i koji djeluju kao fizički nosač za mikroorganizme ili kao izvor hranjivih tvari. Nosači mogu biti inertni (npr. različiti sintetički materijali) i ne-inertni (npr. lignocelulozni materijali) (Pandey i sur., 2008.). Fermentacija na čvrstim nosačima uspješno se primjenjuje za mikrobiološku razgradnju lignocelulozne biomase, odnosno za obradu čvrstog otpada, proizvodnju sekundarnih metabolita i proizvodnju funkcionalne hrane (Zweistra-Hoogschagen, 2007.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati potencijal šest lignoceluloznih otpadnih materijala (piljevina bukve, hrasta i topole, repini rezanci, trop jabuke i pivski trop) kao bioadsorbenasa za uklanjanje sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodenih otopina adsorpcijom. Nadalje, nakon provedene adsorpcije bojila ispitana je mogućnost obezbojenja obojenog lignoceluloznog adsorbensa (pivski trop) biološkom obradom s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor*.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Adsorbensi

Kao adsorbensi korišteni su lignocelulozni otpadni materijali podijeljeni u dvije skupine prema podrijetlu. Prva skupina su bili otpadni materijali iz drvne industrije: piljevine bukve (*Fagus sylvatica* L.), hrasta (*Quercus robur* L.) i topole (*Populus alba* L.). Drugu skupinu činili su otpadni materijali prehrambene industrije: repini rezanci, trop jabuke i pivski trop. Piljevinu bukve, hrasta i topole donirale su „Hrvatske šume“ d.o.o. (Osijek, Hrvatska). Pivski trop dobiven je iz tvornice „Osječka pivovara d.d.“ (Osijek, Hrvatska), a repini rezanci, nastali preradom šećerne repe iz tvornice šećerne industrije „Sladorana Županja d.d.“ (Županja, Hrvatska). Trop jabuke je dobiven s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva koje se bavi proizvodnjom i preradom jabuka.

Svi navedeni adsorbensi su sušeni u sušioniku 48 h pri temperaturi 60 °C i samljeveni prije korištenja, kako bi se osigurala veličina čestica adsorbensa manja od 2 mm. Kao kontrola korišten je aktivni ugljen (SA SUPER 8029-1, Cabot Norit, USA).



Slika 4 Otpadni materijali prehrambene industrije



Slika 5 Otpadni materijali drvne industrije

3.2.2. Adsorbat

Kao adsorbat korišteno je malahitno zelenilo (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska).

3.2.3. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije: NaOH, HCl (oboje Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i krumpirov agar (Biolife, Italija).

3.2.4. Mikroorganizam

U eksperimentima u kojima je istraživana mogućnost obezbojenja obojenih bioadsorbenasa biološkom obradom, kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* AG 613 (Culture Collection of *Basidiomycetes*, Prag, Češka) (**Slika 6**).



Slika 6 *Trametes versicolor* AG 613

3.3. APARATURA

3.3.1. Tehnička i analitička vaga

Uzorci su vagani na tehničkoj vagi (RADWAG; Tehnica unitronik, tip: WPS 1200, Njemačka), a bojilo na analitičkoj vagi (Crystal 200 CE, Gibertini, Italija).

3.3.2. Laboratorijski mlin

Usitnjavanje uzoraka provedeno je na laboratorijskom mlinu (MF10, IKA Labortechnik, Njemačka) pri čemu je korišteno sito otvora očica 2 mm (**Slika 7**).



Slika 7 Laboratorijski mlin

3.3.3. Inkubator

Adsorpcijski eksperimenti provedeni su u termostatu/inkubatoru (BD 53#04-63769, Binder, Tuttlingen, Njemačka). Priprema radne mikrobne kulture, kao i fermentacije na čvrstim nosačima provedene su u inkubatoru (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havočić, Zagreb, Hrvatska).

3.3.4. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na centrifugi (Tehtnica, Centric 150) pri 10 000 g tijekom 5 minuta (**Slika 8**).



Slika 8 Centrifuga

3.3.5. Spektrofotometar

Koncentracija bojila određena je spektrofotometrijski, pomoću UV-VIS spektrofotometra (SHIMADZU, UV-1700 Pharma Spec., Njemačka) (**Slika 9**).



Slika 9 Spektrofotometar

3.3.6. pH-metar

Za mjerenja pH korišten je pH metar (SevenEasy™ pH, Mettler Toledo, Švicarska).

3.3.7. Analizator vlage

Za određivanje udjela vode korišten je halogeni analizator vlage (Mettler Toledo, HR 73, Švicarska) (**Slika 10**).



Slika 10 Analizator vlage

3.3.8. Autoklav

Sterilizacija staklenki, supstrata te hranjivih podloga provedena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).

3.3.9. Sušionik

Sušenje uzoraka provedeno je u sušioniku ST-01/02 (Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb).

3.3.10. Kromametar

Određivanje boje uzoraka provedeno je pomoću kromametra Konica Minolta CR 400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) (**Slika 11**).



Slika 11 Kromametar

3.4. METODE

3.4.1. Šaržni adsorpcijski eksperimenti

U Erlenmeyer-ovu tikvicu od 250 mL dodano je 1 g adsorbensa i 100 mL vodene otopine bojila malahitnog zelenila (adsorbat) koncentracije 15 mg L^{-1} . Eksperiment je proveden stacionarno pri konstantnoj temperaturi od 25°C u inkubatoru, pri čemu pH nije podešavan već samo praćen tijekom eksperimenta. Vrijeme kontakta između bioadsorbensa i adsorbata iznosilo je 300 min, pri čemu su uzorci (2 mL) izuzimani iz tikvica svakih 30 min, kako bi se pratilo uklanjanje bojila u ovisnosti o vremenu kontakta. Uzorci su zatim centrifugirani 5 min pri 10 000 g i 1 mL dobivenog supernatanta korišten je za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije bojila (apsorbancija je određivana pri valnoj duljini od 623 nm).

Postotak uklanjanja bojila izračunava se preko sljedeće jednadžbe:

$$\% \text{ uklanjanja} = ((\gamma_i - \gamma_t) / \gamma_i) \times 100$$

gdje su:

γ_i početna koncentracija adsorbata [mg L^{-1}]

γ_t koncentracija bojila nakon vremena t [mg L^{-1}]

Adsorpcijski eksperimenti kojima je cilj bio istražiti utjecaj početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i promjene pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila provedeni su kao gore opisani eksperimenti, pri čemu su koncentracije bojila iznosile 5, 15, 25, 35 i 50 mg L^{-1} ; mase adsorbensa 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 g; temperature 15, 25 i 35°C te pH otopine bojila 2,5; 4,3 i 6,4. Za korekciju pH korištene su 0,1 i 0,05 M otopine HCl i NaOH.

3.4.2. Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za uzgoj na obojenom pivskom tropu kao čvrstom nosaču

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife, Italija), dodano 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121°C tijekom 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45°C do 50°C . Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana i razlivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Ovako pripremljene podloge korištene su za uzgoj radnog mikroorganizama *T. versicolor*. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27°C .

3.4.3. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstom supstratu (obojeni pivski trop)

Izvagano je 50 g uzorka pivskog tropa i dodano u staklenke. Ovako pripremljeni uzorci u staklenkama su sterilizirani u autoklavu (121 °C, 0,6 - 0,8 bar, 20 min). Nakon hlađenja, u staklenke je dodano 120 mL vodene otopine malahitnog zelenila koncentracije 50 mg L⁻¹ te je sadržaj staklenke dobro izmiješan kako bi se bojilo dobro raspodijelilo po pivskom tropu. Nakon 24 h u uzorcima je određen početni udjel vode koji je iznosio od 62 – 65% za sve uzorke. Nakon toga sadržaj tikvica sterilno je naciepljen s pet micelijskih diskova (promjera 6 mm) kulture *T. versicolor* AG 613 izrezanih pomoću bušača čepova s prethodno pripremljenih agarnih ploča s navedenom kulturom starom 7 dana. Sadržaj staklenke dobro je izmiješan i staklenke su zatvorene (pokrivene) listom sterilnog papirnatog ubrusa učvršćenog gumicom, kako bi se osigurali anaerobni uvjeti i sterilnost unutar staklenke. Abiotičke kontrole nisu naciepljene radnim mikroorganizmom, već pripremljene kako je navedeno gore i također zatvorene sterilnim ubrusom. Ovako pripremljene staklenke stavljene su na inkubaciju 10, 20 i 30 dana, pri čemu je fermentacija provedena stacionarno, odnosno uzorci nisu miješani.

3.4.4. Određivanje udjela vode

Analizator vlage opremljen je vagom i halogenim grijačem koji generira infracrveno zračenje. U malu aluminijsku posudicu ravnomjerno je raspoređen uzorak (oko 3 g). Određivanje vlage temelji se na termogravimetrijskom principu gdje se uslijed zagrijavanja uzorka i isparavanja vode smanjuje masa uzorka do postizanja konstantne mase kada se proces prekida.

3.4.5. Određivanje boje uzorka

U ovom eksperimentalnom radu su praćene a^* , b^* i L^* vrijednosti uzoraka nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije i njihovih pripadajućih abiotičkih kontrola (nakon 10, 20 i 30 dana).

Potrebno je odrediti vrstu boje (crvena, plava, zelena, žuta) u ovisnosti o prevladavajućoj valnoj duljini, zatim zasićenost boje, tj. „kroma“ koja predstavlja intenzitet boje te reflektiranu ili apsorbiranu svjetlost. Ako se u jednakoj mjeri reflektiraju sva valna područja bijele, tj. sunčeve svjetlosti, tada nam se predmet čini bijel. Ako se u potpunosti apsorbira

sunčeva svjetlost, to rezultira crnom bojom predmeta. Mjerenje boje uzorka provedeno je pomoću kromametra. Korišteni tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Predmet se postavlja na otvor mjerne glave promjera 8 mm. U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka, koja pulsiranjem baca svjetlost okomitu na površinu predmeta. Reflektiranu svjetlost mjeri šest vrlo osjetljivih silikonskih fotoćelija. Računalo zapisuje podatke i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; Lab; LCH; Hunter Lab). U radu je korišten *Lab* sustav, koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.

L^* - vrijednosti daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo. Ako je $L^* = 0$, predmet je crn, a ako je $L^* = 100$, predmet je bijel.

a^* - vrijednost može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je crvena boja, a ako je negativna, rezultat je zelena boja.

b^* - vrijednost također može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je žuta boja, a ako je negativna, rezultat je plava boja.

Ukupna promjena boje (ΔE) izračunava se prema jednadžbi:

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

te kao promjena boje (C^*_{ab}):

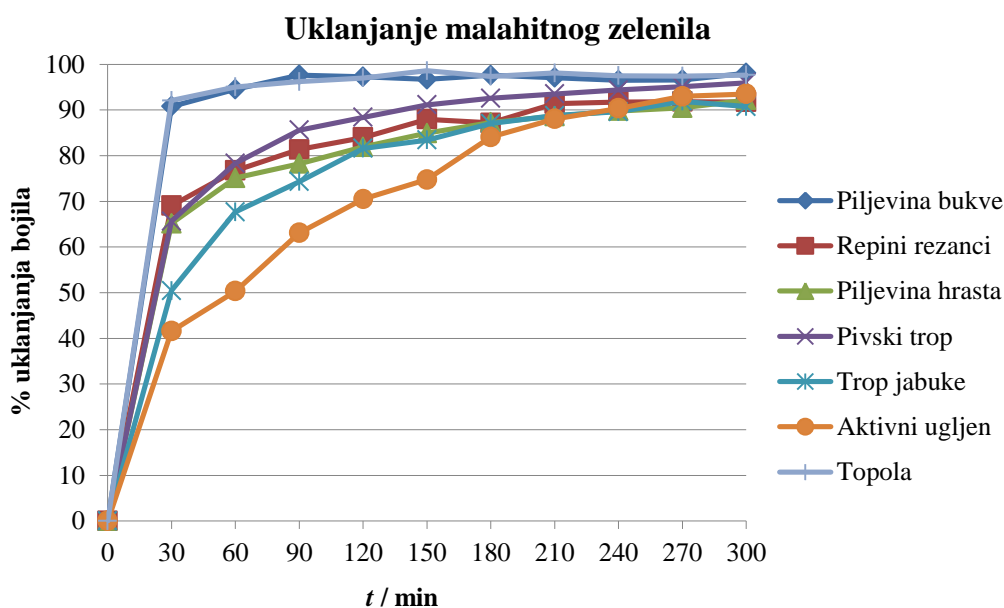
$$C^*_{ab} = \sqrt{[(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UKLANJANJE MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENIH OTOPINA ADSORPCIJOM NA RAZLIČITE LIGNOCELULOZNE MATERIJALE KAO BIOADSORBENSE

Poljoprivredni i prehrambeni otpadni lignocelulozni materijali koji imaju velik udjel celuloze mogu se koristiti kao bioadsorbensi za uklanjanje različitih onečišćujućih tvari iz vodenih otopina. Osnovna karakteristika navedenih materijala je velik broj dostupnih funkcionalnih skupina koje su ključne za adsorpcijske procese.

Otpadni lignocelulozni materijali korišteni u ovom istraživanju odabrani su na osnovu njihove široke rasprostranjenosti i velikih dostupnih količina. Na osnovu gospodarskih aktivnosti pri kojima nastaju mogu se grubo podijeliti na otpadni materijal iz drvne industrije (piljevine bukve, hrasta i topole) i otpadni materijal prehrambene industrije (repini rezanci, trop jabuke, pivski trop). Karakteristika svih navedenih materijala je visoki udjel celuloze koji iznosi od 20% za pivski trop do 45% za piljevine drveta. Kako bi se istražila mogućnost primjene ovih bioadsorbenasa za uklanjanje sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodenih otopina, provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti pri 25 °C s nepromjenjivom količinom bioadsorbensa (1 g), koncentracijom adsorbata od 15 mg L⁻¹ i kontaktnim vremenom od 300 min, bez podešavanja pH. Postotak uklanjanja bojila u ovisnosti o vremenu i bioadsorbensu prikazan je na **Slici 12**.



Slika 12 Uklanjanje malahitnog zelenila adsorpcijom na različite bioadsorbense ($m_{\text{bioadsorbensa}} = 1 \text{ g}$, $\gamma_{\text{otopina bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ °C}$)

Nakon 300 min postignut je visok stupanj uklanjanja bojila (> 90%) upotrebom svih ispitanih bioadsorbensa. Zbog njihove kemijske strukture, odnosno velikog udjela celuloze, prisutan je velik broj hidroksilnih skupina koje su uključene u adsorpcijske procese (O'Connell i sur., 2008.), odnosno dostupne su za vezanje molekule bojila. U početnim fazama eksperimenta (prvih 30 min) uklanjanje bojila je vrlo intenzivno, pri čemu se po učinkovitosti ističu piljevina bukve i topole gdje je postotak uklanjanja bojila veći od 90%. Ovo se može objasniti već spomenutim velikim brojem hidroksilnih skupina dostupnih za vezanje bojila, jer udjel celuloze u ovim piljevinama iznosi 40 - 45%. U početnim fazama eksperimenta svi korišteni bioadsorbensi bili su učinkovitiji od aktivnog ugljena koji je služio kao kontrola. Nakon intenzivnog uklanjanja bojila u početnoj fazi eksperimenta, postotak uklanjanja i dalje raste, ali značajno sporije, da bi nakon 300 min došlo do zasićenja bioadsorbensa. Najveći postotak uklanjanja bojila nakon 300 min postignut je upotrebom piljevina bukve i topole kao bioadsorbensa i iznosio je 98%. Postotak uklanjanja nakon 300 min za sve ostale korištene adsorbense, uključujući i aktivni ugljen, iznosio je od 90 do 95%.

Tablica 1 prikazuje promjene pH vrijednosti vodene otopine bojila tijekom provođenja adsorpcijskih eksperimenta.

Tablica 1 Promjene pH tijekom eksperimenata sa bioadsorbensima

Bioadsorbens ($m = 1$ g)	pH				
	Malahitno zelenilo ($\gamma = 15 \text{ mg L}^{-1}$)				
	t / min				
	0	30	60	150	300
Piljevina bukve	7,2	7,2	7,2	7,3	7,2
Repini rezanci	5,9	6,1	6,1	6,1	6,1
Piljevina hrasta	4,8	4,9	4,9	4,8	4,8
Pivski trop	6,1	6,1	6,1	6,1	6,0
Trop jabuke	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6
Aktivni ugljen	6,7	6,8	7,0	7,0	7,0
Topola	7,7	7,6	7,7	7,7	7,7

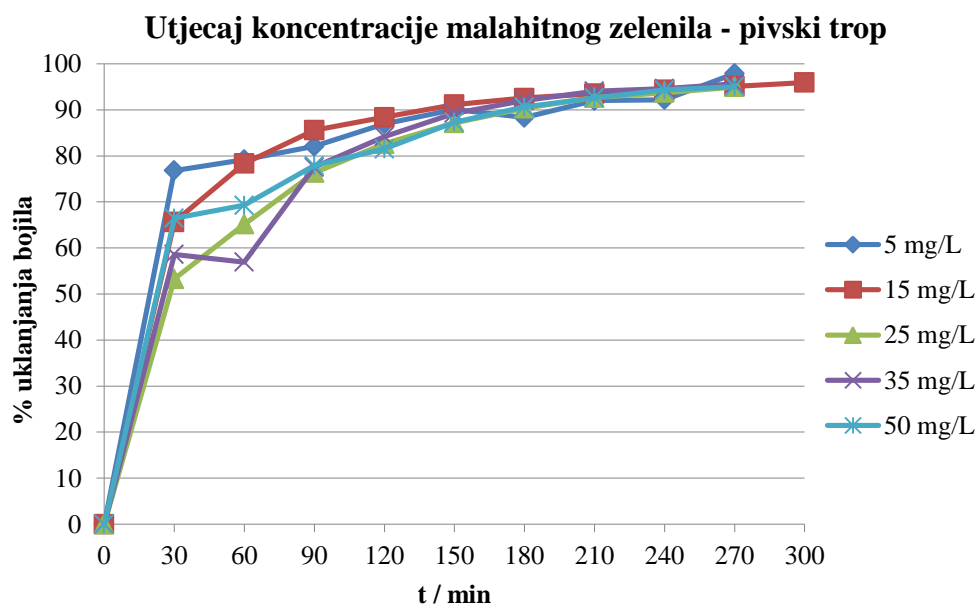
pH je važan parametar koji utječe na adsorpciju, a tijekom provođenja ovog dijela istraživanja pH nije podešavan niti održavan konstantnim, već samo praćen tijekom eksperimenta. pH vrijednosti vodenih otopina bojila s bioadsorbensom bile su uglavnom u neutralnom području ili blago kiselom/lužnatom, osim kada je kao bioadsorbens korišten trop jabuke pri čemu je pH vrijednosti iznosila 3,5. Trop jabuke pokazao se manje učinkovit u uklanjanju bojila, posebno u početnim fazama eksperimenta. Ovo je u skladu s istraživanjima koje su proveli Low i suradnici (2011.) koji navode da kiseli medij nepovoljno utječe na adsorpciju kationskih bojila, poput malahitnog zelenila. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se navedeno dodatno potvrdilo. Tijekom provođenja eksperimenata nije došlo do značajnih promjena pH sustava otopina bojila/bioadsorbens.

Na temelju rezultata dobivenih u ovom dijelu istraživanja, iz svake od dviju skupina bioadsorbensa odabran je po jedan s kojim su u nastavku istraživanja provedeni adsorpcijski eksperimenti. Odabrani bioadsorbensi su bili pivski trop i piljevina topole.

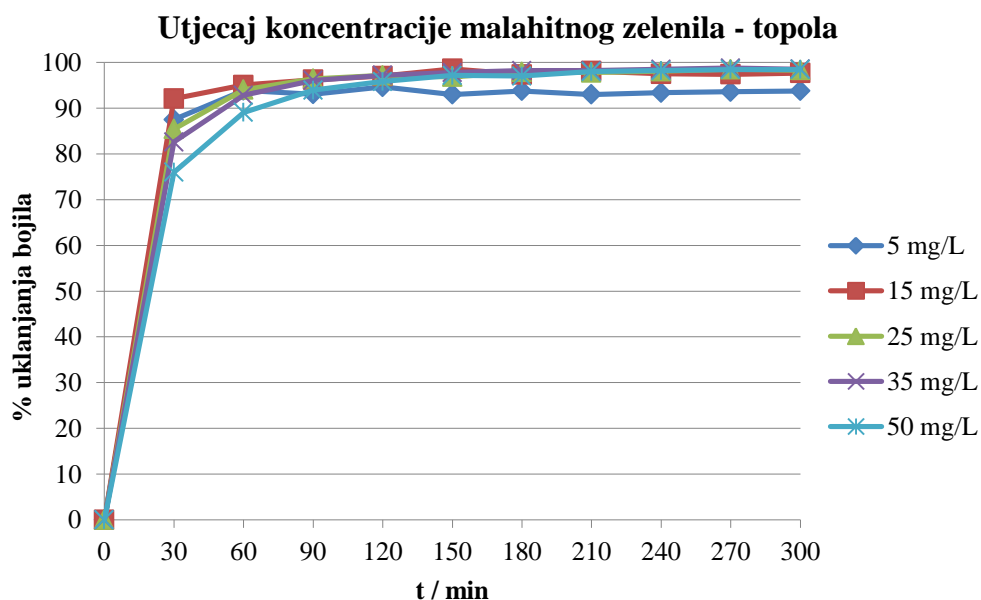
4.2. UTJECAJ KONCENTRACIJE BOJILA NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILO IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PILJEVINU TOPOLE I PIVSKI TROP KAO BIOADSORBENSE

Kako bi se istražio utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom, provedeni su eksperimenti sa sljedećim koncentracijama bojila: 5, 15, 25, 35 i 50 mg L⁻¹. Dobiveni rezultati su prikazani na **Slikama 13 i 14**. Koncentracija adsorbata i vrijeme kontakta između adsorbensa i adsorbata igra važnu ulogu u procesima uklanjanja onečišćujućih tvari iz vodenih otopina, odnosno otpadnih voda, adsorpcijom. Intenzivno uklanjanje onečišćujućih tvari i uspostavljanje ravnoteže u kratkom vremenu značajka je učinkovitih adsorbensa, koji se mogu primijeniti u obradi otpadnih voda. Što je veća koncentracija onečišćujućih tvari (adsorbata) u otpadnoj vodi, manji je volumen vode koji određena masa adsorbensa može pročititi (Khatti i Singh, 2009.). Za oba korištena bioadsorbensa uočena je razlika u postotku uklanjanja bojila za različite koncentracije bojila u početnim fazama eksperimenta (prvih 30 min), pri čemu je veći postotak uklanjanja postignut pri manjim koncentracijama bojila (5 i 15 mg L⁻¹). Navedena razlika u postotku uklanjanja pri različitim koncentracijama bojila smanjuje se u kasnijim fazama eksperimenta. Ovo je u skladu s prijašnjim istraživanjima koje su proveli Khattri i sur.

(2009.) kako bi ispitali utjecaj početne koncentracije malahitnog zelenila i vremena kontakta s piljevinom *Azadirachta indica* kao bioadsorbensom. Rezultati su pokazali da povećanjem koncentracije malahitnog zelenila od 6 do 12 mg L⁻¹ dolazi do smanjenja postotka uklanjanja bojila od 84,93 do 71,25%.



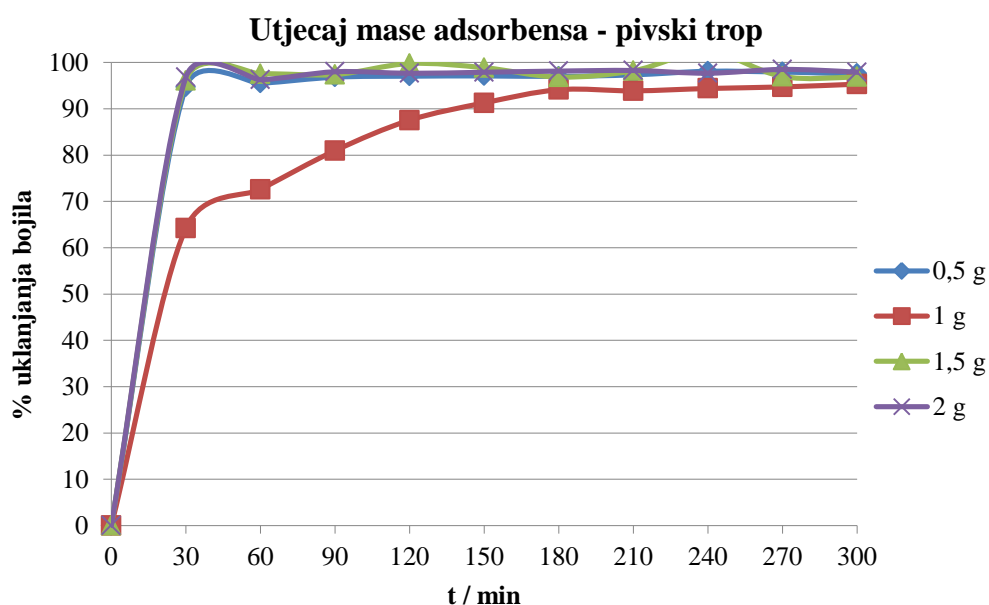
Slika 13 Utjecaj koncentracije malahitnog zelenila na postotak njegova uklanjanja iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}} = 1\text{g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 5, 15, 25, 35, 50\text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100\text{ mL}$, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)



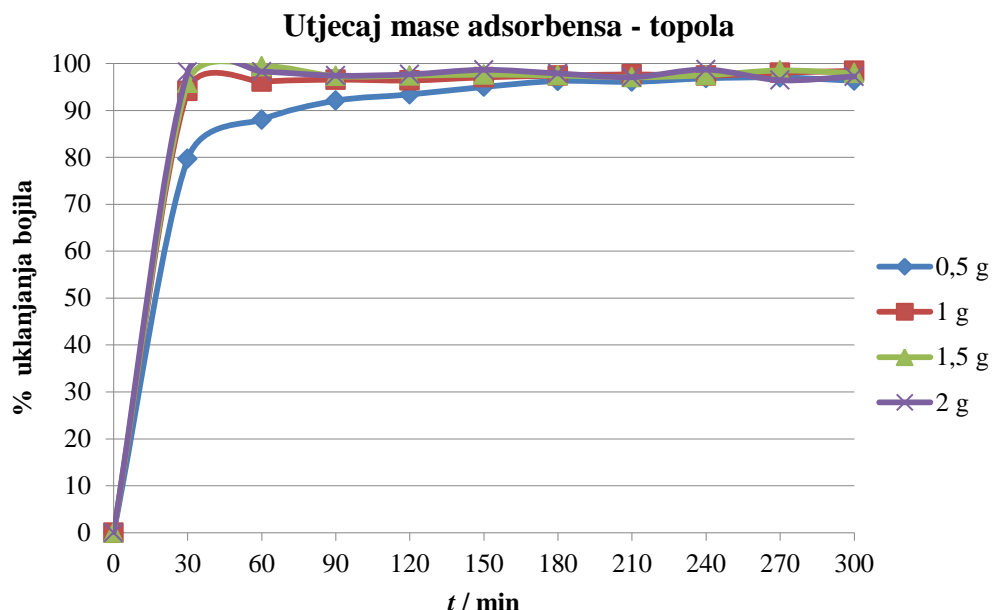
Slika 14 Utjecaj koncentracije malahitnog zelenila na postotak njegova uklanjanja iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole ($m_{\text{topola}} = 1\text{g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 5, 15, 25, 35, 50\text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100\text{ mL}$, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

4.3. UTJECAJ MASE ADSORBENSA NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Kako bi se istražio utjecaj mase adsorbensa na uklanjanje malahitnog zelenila iz vodene otopine, provedeni su eksperimenti s različitim masama adsorbensa (0,5; 1; 1,5 i 2 g) i koncentraciji bojila od 15 mg L^{-1} . S povećanjem mase bioadsorbensa zabilježeno je vrlo malo povećanje postotka uklanjanja bojila (1-2%) kada je kao bioadsorbens korišten pivski trop. Kada je kao bioadsorbens korištena piljevina topole nakon 30 min eksperimenta došlo je do kontinuiranog porasta postotka uklanjanja od 79,65 do 98,1% s porastom mase bioadsorbensa (od 0,5 do 2 g) (**Slike 15 i 16**). Nakon 300 min nije bilo razlike u postotku uklanjanja, neovisno o masi piljevine. Ovo je u skladu s rezultatima drugih istraživača koji su također ispitivali utjecaj mase adsorbensa na uklanjanje malahitnog zelenila i metilenskog plavila iz vodenih otopina (Wong i sur., 2013.; Hameed, 2009.). Povećanje postotka uklanjanja bojila s povećanjem mase bioadsorbensa može se objasniti povećanjem kontaktne površine, odnosno adsorpcijskih mjesta na koja se mogu vezati molekule bojila (Liu i sur., 2011.). Izuzetak je eksperiment s 1 g pivskog tropa kao bioadsorbensom, koji ne slijedi ovaj trend.



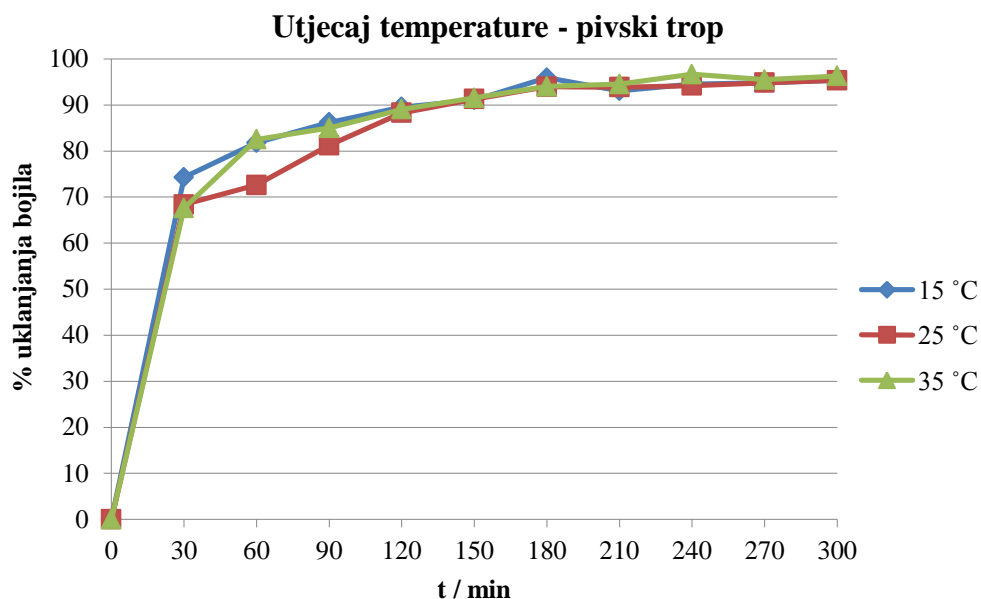
Slika 15 Utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}} = 0,5; 1; 1,5; 2 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)



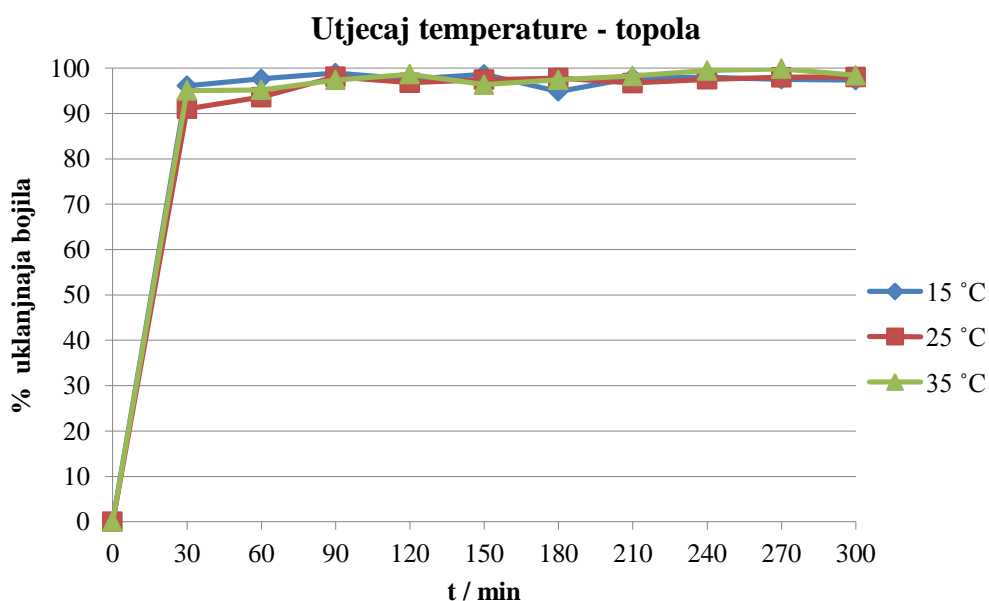
Slika 16 Utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole ($m_{\text{topola}} = 0,5; 1; 1,5; 2 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

4.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Kako bi se ispitao utjecaj temperature na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop i piljevinu topole kao bioadsorbense, provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti pri temperaturama od 15, 25 i 35 °C. Dobiveni rezultati prikazani na **Slikama 17** i **18** pokazali su da povećanjem temperature nije došlo do značajnog povećanja intenziteta i postotka uklanjanja bojila za oba korištena bioadsorbensa. Istraživanje koje su proveli Nigam i suradnici (2000.), koristeći stabljiku pšenice, piljevinu drveta i kukuruzne oklaske kao bioadsorbense za uklanjanje različitih tekstilnih bojila iz vodenih otopina, pokazalo je da povećanje temperature nije imalo značajnog utjecaja na adsorpcijski kapacitet navedenih bioadsorbensa. Nadalje, zaključili su da iako povećanjem temperature nije došlo do povećanja postotka uklanjanja bojila, rezultati istraživanja imaju praktičnu vrijednost, jer pokazuju da se uklanjanje bojila adsorpcijom može provesti i u efluentima (otpadne vode) gdje je prisutno toplinsko onečišćenje bez prethodnog hlađenja.



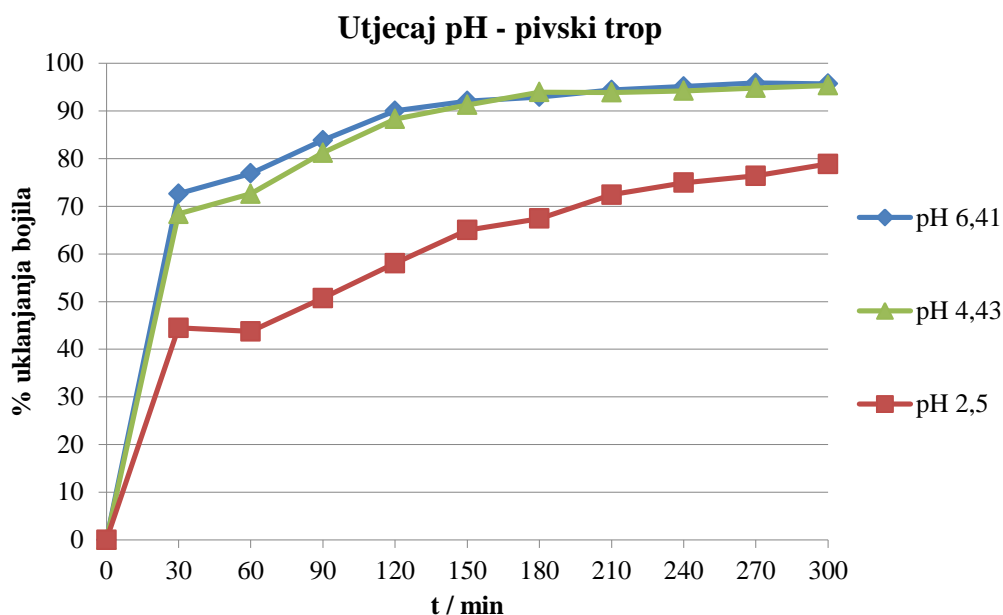
Slika 17 Utjecaj temperature na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}} = 1 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 15, 25, 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$)



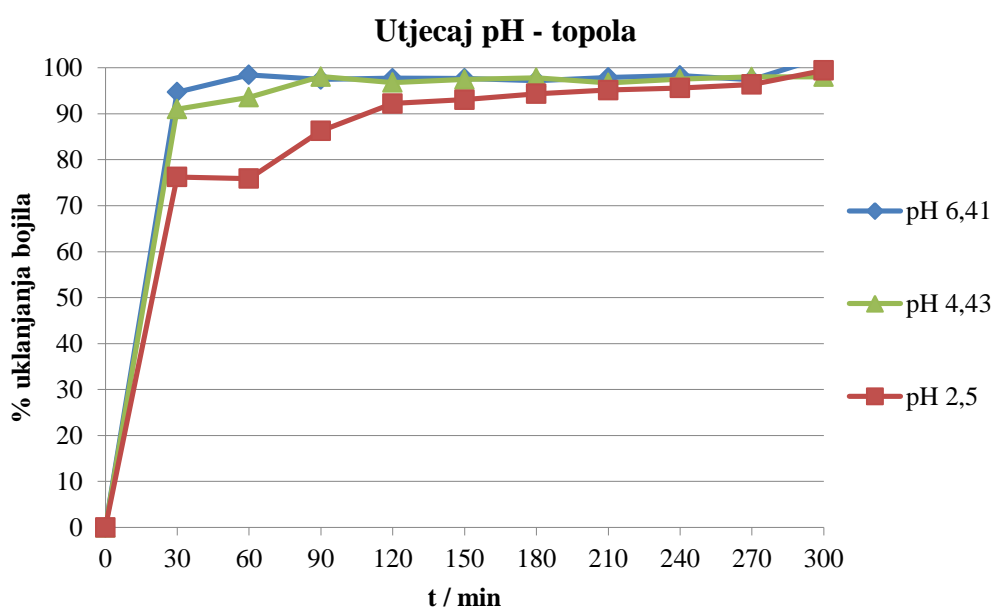
Slika 18 Utjecaj temperature na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole ($m_{\text{topola}} = 1 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 15, 25, 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

4.5. UTJECAJ PH NA POSTOTAK UKLANJANJA MALAHITNOG ZELENILO IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Utjecaj pH na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodenih otopina ispitan je pri nativnom pH vodene otopina bojila 15 mg L^{-1} bez podešavanja, koji je iznosio 4,43 te pH vrijednostima 2,5 i 6,4. Rezultati su prikazani na **Slikama 19 i 20**. pH vodenog okoliša značajno utječe na uklanjanje onečišćujućih tvari iz vodenih otopina (otpadnih voda) adsorpcijom. Promjena pH utječe na adsorpcijski proces preko disocijacije funkcionalnih skupina adsorbata i adsorbensa (Khatti i Singh, 2009.). Pivski trop i topola u svom sastavu imaju veliki udjel celuloze, kao i lignina. Površina celuloze u kontaktu s vodom ima negativan naboj. Bazična bojila, poput malahitnog zelenila, koja ionizacijom daju obojeni kationski dio bit će privučena anionskom strukturom adsorbensa (Mckay i sur., 1980.). Postotak uklanjanja malahitnog zelenila primjenom lignoceluloznih materijala kao adsorbenasa povećava se s povećanjem pH otopine. Khattri i Singh (2009.) ispitivali su utjecaj pH na adsorpciju malahitnog zelenila na piljevinu *Azadirachta indica*. Rezultati su pokazali da je u alkalnom mediju površina adsorbensa negativno nabijena te privlači pozitivno nabijeni adsorbat, što rezultira povećanjem adsorpcije bojila, odnosno većim postotkom uklanjanja bojila iz vodenih otopina.



Slika 19 Utjecaj pH na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}} = 1 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4,43; 6,41; 2,5)

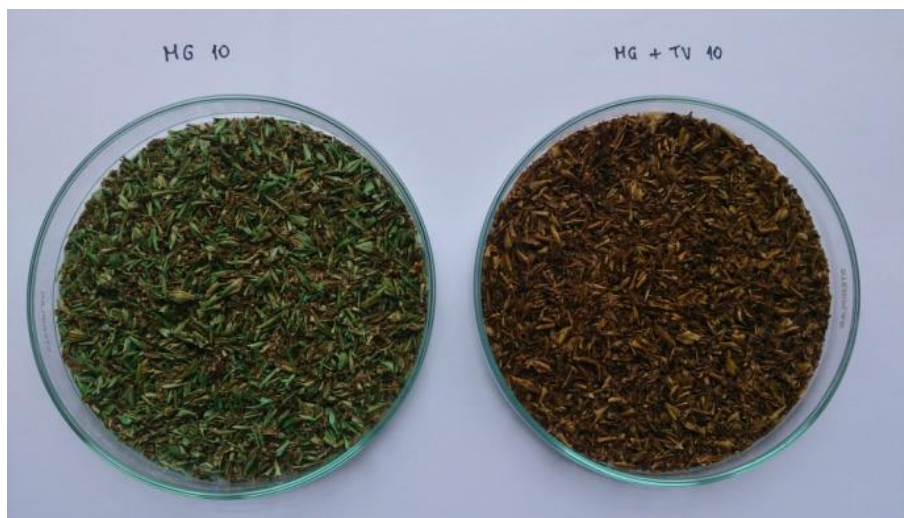


Slika 20 Utjecaj pH na postotak uklanjanja malahitnog zelenila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole ($m_{\text{topola}} = 1 \text{ g}$, $\gamma_{\text{bojila}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $V_{\text{otopina bojila}} = 100 \text{ mL}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4,43; 6,41; 2,5)

4.6. BIOLOŠKA OBRADA OBOJENOG PIVSKOG TROPA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. VERSICOLOR*

Kako bi se istražila mogućnost ekološki prihvatljivog načina zbrinjavanja obojenog lignoceluloznog materijala zaostalog nakon procesa uklanjanja bojila adsorpcijom, proveden je uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, gdje je kao nosač/supstrat korišten pivski trop obojen malahitnim zelenilom. Gljive bijelog truljenja, odnosno ekstracelularni lignolitički enzimi koje sintetiziraju, često su korišteni u istraživanjima u svrhu bioremedijacije obojenih otpadnih voda (Xavier i sur., 2007.).

Na **Slikama 21 - 23** su prikazani uzorci obojenog pivskog tropa nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije pomoću *T. versicolor* u odnosu na odgovarajuće abiotičke kontrole (nakon 10, 20 i 30 dana). Iz slika je vidljivo da već nakon 10 dana dolazi do smanjenja intenziteta boje u fermentiranom uzorku u odnosu na abiotičku kontrolu, dok nakon 30 dana dolazi do gotovo potpunog obezbojenja fermentiranog uzorka.



Slika 21 Izgled obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa i abiotičke kontrole nakon 10 dana

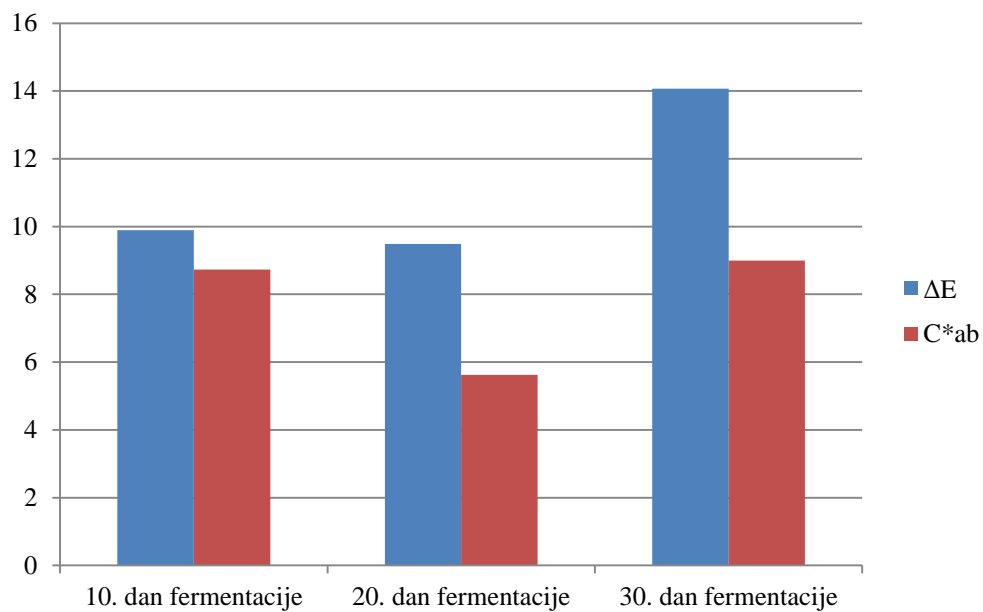


Slika 22 Izgled obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa i abiotičke kontrole nakon 20 dana



Slika 23 Izgled obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa i abiotičke kontrole nakon 30 dana

Boja fermentiranih uzoraka i abiotičkih kontrola određena je kromametrijski. **Slika 24** pokazuje ukupnu promjenu boje i promjenu intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije. Iz grafa je vidljivo da dolazi do ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranog uzorka u odnosu na abiotičku kontrolu, pri čemu je ta promjena najveća nakon 30 dana, kao rezultat obezbojenja uzorka obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor*.



Slika 24 Ukupna promjena boje i intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije

Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se razjasnili mehanizmi uklanjanja bojila, odnosno definirali nastali razgradni produkti u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja moguće je izvesti sljedeće zaključke:

Upotrebom svih ispitanih lignoceluloznih otpadnih materijala iz drvne industrije (piljevine bukve, hrasta i topole) i prehrambene industrije (repini rezanci, trop jabuke i pivski trop) kao bioadsorbensa za uklanjanje sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodenih otopina postignut je stupanj uklanjanja bojila veći od 90%.

U početnim fazama eksperimenta (prvih 30 min) uklanjanje bojila je bilo vrlo intenzivno, pri čemu se po učinkovitosti ističu piljevine bukve i topole gdje je postotak uklanjanja bojila veći od 90%. Najveći postotak uklanjanja bojila nakon 300 min postignut je upotrebom piljevina bukve i topole kao bioadsorbenasa i iznosio je 98%. Postotak uklanjanja bojila postignut nakon 300 min korištenjem ostalih adsorbensa, uključujući i aktivni ugljen, iznosio je od 90 do 95%.

Piljevina topole i pivski trop pokazali su se najpogodniji za daljnja istraživanja, pri čemu je ispitan utjecaj početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i pH na postotak uklanjanja malahitnog zelenila.

Za oba korištena bioadsorbensa uočena je razlika u postotku uklanjanja bojila za različite koncentracije bojila u prvih 60 min eksperimenta, pri čemu je veći postotak uklanjanja postignut pri manjim koncentracijama bojila (5 i 15 mg L⁻¹). Nakon 300 min, navedena razlika u postotku uklanjanja pri različitim koncentracijama bojila bila je neznatna.

S povećanjem mase bioadsorbensa zabilježeno je vrlo malo povećanje postotka uklanjanja bojila (1-2%) kada je kao bioadsorbens korišten pivski trop. Kada je kao bioadsorbens korištena piljevina topole nakon 30 min eksperimenta došlo je do kontinuiranog porasta postotka uklanjanja od 79,65 do 98,1% s porastom mase bioadsorbensa (od 0,5 do 2 g). Nakon 300 min nije bilo razlike u postotku uklanjanja, neovisno o masi piljevine.

Povećanjem temperature provođenja adsorpcijskih eksperimenata od 15 do 35 °C nije došlo do značajnijeg povećanja brzine i postotka uklanjanja bojila za oba korištena bioadsorbensa.

Postotak uklanjanja malahitnog zelenila primjenom lignoceluloznih materijala kao adsorbenasa povećava se s povećanjem pH otopine, pri čemu jako kiseli medij (pH 2,5) nepovoljno utječe na adsorpciju kationskih bojila što se ogleda u značajno manjem postotku uklanjanja bojila.

Biološkom obradom pivskog tropa obojenog malahitnim zelenilom pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* uzgajane u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do vizualnog smanjenja intenziteta boje u fermentiranom uzorku u odnosu na abiotičku kontrolu već nakon 10 dana fermentacije, dok nakon 30 dana dolazi do gotovo potpunog obezbojenja fermentiranog uzorka.

6. LITERATURA

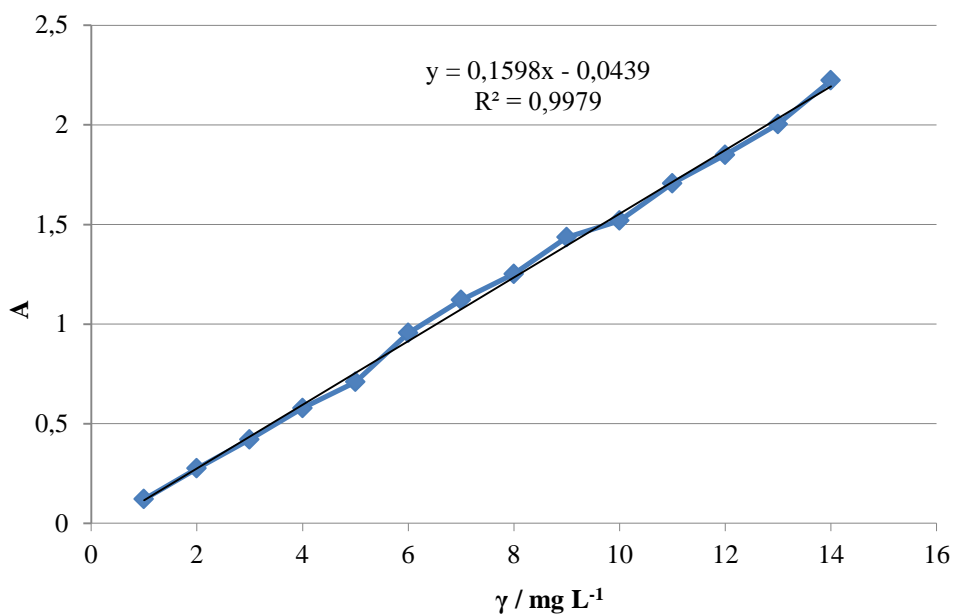
- Alonso D., Martins B., Ferreira H., Simoes R., Leite R., Ferreira H., Souza M.M.: Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. U *Integrated Waste Management – Volume II*. Mr. Sunil Kumar (Ed.), *InTech*, Brazil, 2005.
- Anbia M., Ghaffari A.: Removal of Malachite Green from Dye Wastewater Using Mesoporous Carbon Adsorbent. *J Iran Chem Soc*, 8: 67-76, 2011.
- Azmi W., Sani R.K., Banerjee U.C.: Biodegradation of triphenylmethane dyes, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 22, Pages 185–191, 1998.
- Bailey S.E. et al., A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals, *Water Res.* 33 2469-2479, 1999.
- Cheriaa J., Khaireddine M., Rouabhia M., Bakhrouf A.: Removal of Triphenylmethane Dyes by Bacterial Consortium, *The Scientific World Journal*, 9 pages, 2012.
- Eichlerova I., Homolka L., Benada O., Kofronova O., Hubalek T., Nerud F.: Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere*, 69:795-802, 2007.
- Enciklopedija Britannica Online: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/174980/dye> [7.11.2014.]
- Faust S.D., Aly O.M.: Chemistry of Water Treatment, 2nd Edition, Lewis Publishers, Washington D.C., str. 127, 136-140, 217-218, 1999.
- Forgacs E., Cserhati T., Oros G., Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Enviroment International* 30, 953-971, 2004.
- Garg VK, Amita M., Kumar R., Gupta R.: Basic dye (methylene blue) removal from simulated wastewater by adsorption using Indian Rosewood sawdust: a timber industry waste. *Dyes Pigments*, 63(3);243-50, 2004.
- Ghoreishi, S.M., Haghighi, R.: Chemical catalytic reaction and biologicaloxidation for treatment of non-biodegradabletextile effluent. *Chem. Eng. J.* 95, 163–169, 2003.
- Gudelj I., Hrenović J., Landeka T., Dragičević, Delaš F., Šoljan V. i Gudelj H: Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnološke strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, Volume 62, Stranice 91.-100., 2011.
- Gupta V.K.: Aplication of low cost adsorbents for dye removal - A review. *Journal of Environmental Management* 90, 2313-2342, 2009.
- Hameed, B.H.: Removal of cationic dye from aqueous solution using jackfruit peel as non-convention allow-costadsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 344–50, 2009.

- Janušić V, Ćurić D, Krička T, Voća N, Matin A: Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Stručni članak*, 2008.
- Jurac Z., Felić E., Jurac V.: Otpadne vode u pamučnoj industriji Duga Resa, UDK 628.316:677, 2008.
- Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu. Zavod za organsku tehnologiju. Tehnološki procesi organske industrije III. *Bojila i bojenje* (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf, [7.12.2014.]
- Khattari, S. D., & Singh, M. K.: Removal of malachite green from dye wastewater using neem saw dust by adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3), 1089–94, 2009.
- Liu R., Zhang B., Nei D., Zhang H., Liu J.: Adsorption of methyl violet from aqueous solution by halloysite nanotubes. *Desalination* 268, 111-116, 2011.
- Low, W.L., Teng, T.T., Ahmad, A., Morad, N., Wong, Y.S.: A novel pretreatment method of lignocellulosic material as adsorbent and kinetic study of dye waste adsorption, *Water Air Poll.* 218, 293-306, 2011.
- Mckay G., Otterburn M.S., Sweeney A.G.: The removal of colour from effluent using various adsorbents. IV. Silica: Equilibria and column studies, *Water Res.* 14 21-27, 1980.
- Mussato S.I., Dragone G., Roberto I.C.: Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential application, *J.Cereal Sci.* 43, 1-14, 2006.
- Mussato S.I., Teixeira J.A.: Lignocellulose as a raw material in fermentation processes. Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal, 897-907, 2010.
- Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D., & Marchant, R.: Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues, *Bioresource Technology*, 72, 219–226, 2000.
- O'Connell, D.W., Birkinshaw, C., O'Dwyer, T.F.: Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review, *Bioresource Technol.* 99, 243-250, 2008.
- Ogugbue C.J., Sawidis T.: Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent, *Biotechnology Research International*, Volume 2011, 11 pages, 2011.
- Pandey A., Soccol CR., Larroche C.: Current Development sin Solid-state Fermentation. Springer Science/Asiatech Publishers, Inc., New York, USA/New Delhi, India, 13-25, 2008.
- Pervan S., Antonović A., Humar M., Straže A. i Gorišek Ž.: Kemizam promjene boje parene i kuhane orahovine (*Juglans regia* L.), *Drv. Industrija.*, vol. 57, br. 3, str. 127-133, 2006.
- Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R., Ahmad, A.: Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 70–80, 2010.

- Sandhya S., Padmavathy S., Swaminathan K., Subrahmanyam YV, Kaul SN: Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochem*, 40:885-90, 2005.
- Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S., Govindwar S.P.: Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 42, Pages 138–157, 2011.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E.: Fungal Strategies for Lignin Degradation. In Lapierre C., Jouanin L. (Eds) LIGNINS: BIOSYNTHESIS, BIODEGRADATION AND BIOENGINEERING in: *Advances in Botanical Research*, 61:263-308. Elsevier, Amsterdam, 2012.
- Singh, G., Koerner T., Gelinas J.-M., Abbott M., Brady B., Huet A.-C., Charlier C., Delahaut P., Godefroy S.B.: Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. *Food Addit. Contam. A* 28, 731-739, 2011.
- Sjostrom E.: *Wood Chemistry. Fundamentals and Application*, 2nd ed.: Academic press, San Diego, USA, 292, 1993.
- Spagnuolo, M., Crecchio, C., Pizzigallo, M.D.R., Ruggiero P.: Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. *Bioresource Technolo.* 60, 215-222, 1997.
- Srivastava S., Sinha R., Roy D.: Toxicological effects of Malachite Green. *Aquatic Toxicol*, 66: 319-29, 2004.
- Tehnologija bojila i pigmenata, *Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemiju*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, *Interna skripta*
- Wang, G.H., Thomas, R.L.: Direct use of apple pomace in bakery products, *J. Food Sci.* 54, 618-629, 1989.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22, 161–187, Elsevier, 2003.
- Wong, Y.C., Senan M.S.R., Atiqah N.A.: Removal of Methylene Blue and Malachite Green Dye Using Different Form of Coconut Fibre as Absorbent. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 9, 172–177, 2013.
- Xavier A M R B, Tavares A P M, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 10, No. 3, 2007.
- Zweistra-Hoogschagen Marisca: Macroscopic modelling of solid-state fermentation. Doktorski rad. Wageningen Universiteit, Wageningen, 2007.

7. PRILOZI

Prilog 1 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije malahitnog zelenila



Prilog 2 Apsorpcijski spektri malahitnog zelenila snimani pri različitim pH vrijednostima

